

восстанавливалась после гемодиализа, а сывороточный альбумин обладал спектрально-флуоресцентными свойствами, характерными для молекул альбумина после воздействия пероксинитрита.

Тиамин оказывал защитный эффект и ингибировал нитрование ароматических остатков белка под действием пероксинитрита. Как известно, тиамин и его метаболиты являются эффективными скэвенджерами пероксинитрита [7]. Поэтому, мы предполагаем, что благоприятный терапевтический эффект тиамина сопровождающийся тенденцией к нормализации уровня продуктов азотистого обмена, частичным восстановлением лиганд-транспортных свойств сывороточного альбумина может быть связан с разрушением токсичного пероксинитрита.

#### *Литература*

1. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) *Nature*, vol. 327, pp. 524 – 526.
2. Wink D.A., Mitchell J.B. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 25, pp. 434–456.
3. Uppu R.M., Pryor W.A. // *Methods Enzymol.*-1996.-Vol. 269.-P. 322-329.
4. Green D., Wagner A., Glogowski J. e.a. *Anal. Biochem.*-1982.-Vol. 126.-P. 131-135.
5. Pietraforte D., Mallozzi C., Scorza G., Minetti M. *Biochemistry*.-1995.-Vol. 34.-P. 1177-1185.
6. Saville B. *Analyst*.-1958.-Vol. 83.-P. 670-672.
7. Stepuro I.I. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 2005, vol. 72, p. 115-127.

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА С ТИАМИНОМ**

**Адамчук Р.И., Степура А.И., Степура И.И.**

***ГНУ «Институт биохимии НАН Беларуси», Беларусь***

Как известно, пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>) – сильный окислитель, ответственный за сосудистые повреждения при диабете и атеросклерозе. Пероксинитрит эффективно нитрует остатки тирозина в различных ферментах и таким образом инактивирует их [1]. Одним из наиболее восприимчивых сосудистых ферментов к нитрующему действию пероксинитрита является простаглицинсинтаза [2]. Простаглицин - основной протектор стенки сосудов при диабетических и атеросклеротических ангиопатиях, в то время как роль оксида азота проявляется главным образом в защите против артериального тромбоза [3]. Ранее было показано, что тиамин окисляется пероксинитритом с образованием флуоресцирующих продуктов, а также дисульфида тиамина [i]. В данной работе исследовали ингибирование тиамином и его гидро-

фобным метаболитом - тиохромом реакции нитрования пероксинитритом тирозина и тирозинильных остатков белков.

### *Материал и методы исследования*

Пероксинитрит получали по ранее описанному методу [5]. Идентификацию продуктов окислительной трансформации тиамина под действием пероксинитрита измеряли используя комплекс хроматографических и спектрально-флуоресцентных методов [i]. Концентрацию 3-нитротирозина определяли спектрофотометрически ( $\epsilon_{428} = 4200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), при pH 9,0.

### *Результаты исследований и их обсуждение*

После добавления пероксинитрита к водным растворам тиамин в нейтральной и щелочной средах образуется тиаминдисульфид и флуоресцирующие соединения, а также продукты, обладающие характерным поглощением с максимумом при 295 нм. Реакция между тиамином и пероксинитритом протекает очень быстро в течение нескольких секунд. Это связано с тем, что пероксинитрит неустойчив в нейтральной среде и трансформируется в нитрат, со временем полупревращения при pH 6,8 равным 0,5 сек. Поэтому после добавления эквимольных концентраций пероксинитрита к тиамину, наблюдали малый выход продуктов окисления в нейтральной среде.

Повторное добавление пероксинитрита к буферному раствору тиамин в нейтральной среде или в слабо-щелочных средах сопровождалось возрастанием содержания бесцветных продуктов деградации тиамин, поглощающих в области длин волн короче 300 нм. Выход флуоресцирующих продуктов слабо возрастал с увеличением концентрации пероксинитрита (рис. 1). В то же время количество разрушенного тиамин было значительным. Например, после добавления пероксинитрита (0,5 мМ) к буферному раствору тиамин pH 7,8 (0,1 мМ) количество разрушенного тиамин составило 55 %, а доля флуоресцирующих продуктов составляла менее 1 %. После добавления тирозина к буферному раствору тиамин и последующего воздействия пероксинитрита наблюдали увеличение выхода флуоресцирующих продуктов окисления тиамин в несколько раз (рис. 1, кривая 2). Причем, при увеличении концентрации тирозина в растворе симбатно возрастал выход флуоресцирующих продуктов.

Спектрально-флуоресцентными методами, а также методами хроматографии на бумаге и методами масс-спектрометрии флуоресцирующие продукты были идентифицированы, как тиохром и оксидигидротιοхром.

Тиохром и оксидигидротиохром не были конечными продуктами окисления тиамин и в нейтральной среде, под действием пероксинитрита, быстро разрушались с образованием нефлуоресцирующих продуктов, поглощающих в более коротковолновой области менее 300 нм.

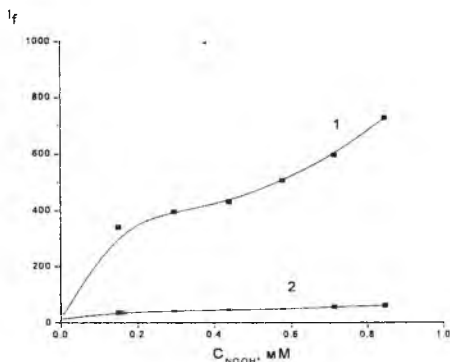


Рис. 1. Образование флуоресцирующих продуктов при воздействии пероксинитрита на тиамин в присутствии D-тирозина (1) и образование флуоресцирующих продуктов при воздействии пероксинитрита на тиамин в отсутствие D-тирозина (2) в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4.  $C_{\text{тиамин}} = 9,26 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{\text{Тур}} = 1,39$  мМ.

Суммируя полученные данные можно заключить, что при воздействии пероксинитрита на тиамин в слабощелочной среде pH 7,5-9,5 наблюдается образование небольших количеств дисульфида тиамин, а основная масса тиамин окисляется пероксинитритом через трициклическую форму тиамин последовательно в тиохром, оксидигидротиохром, бесцветные продукты, поглощающие при 295 нм. Дальнейшее повышение значения pH среды увеличивает выход дисульфида тиамин после воздействия пероксинитрита.

Поэтому в слабощелочной среде с pH среды 7,5-10,0 в присутствии пероксинитрита практически весь тиамин проходит последовательную цепочку превращений: тиамин → трициклическая форма тиамин → тиохром → оксидигидротиохром и затем образуются бесцветные продукты (схема 1).

***Конкурентные взаимоотношения между тиамином и тиохромом в реакциях пероксинитрита с органическими соединениями.***

Тиамин, тиохром и оксидигидротиохром защищали тирозин от модификации пероксинитритом.

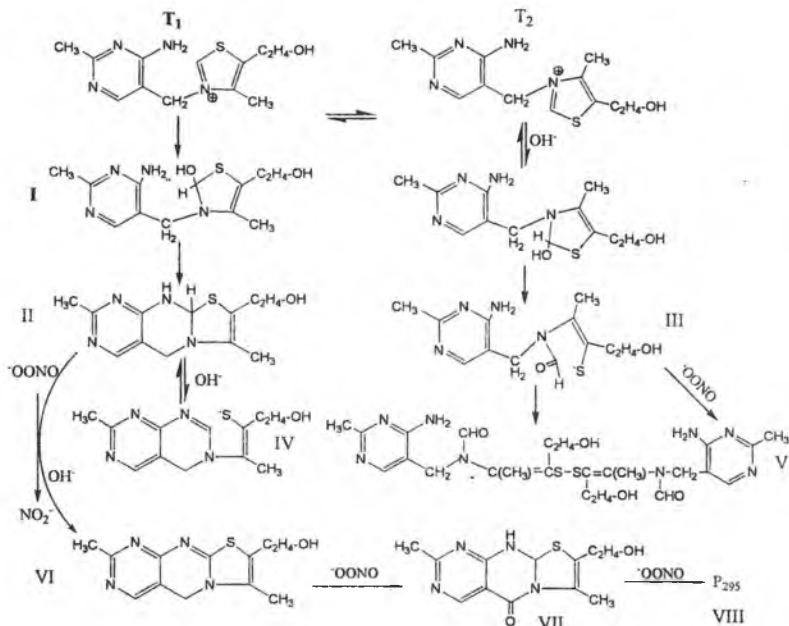


Схема 1. Окислительная трансформация тиаминa (Т) под действием пероксинитрита [i].  $T_1$ - конформер тиаминa у которого расстояние между аминогруппой пиримидинового цикла и вторым углеродом тиазолового цикла составляет 3,7 Å, для конформера  $T_2$  – это расстояние составляет 5,4 Å, соответственно. I - псевдооснование Т, II - трициклическая форма Т, III - тиольная форма Т, IV - желтая тиольная форма Т, V-тиаминдисульфид. VI - тioxром, VII - оксодигидротioxром, VIII - бесцветные продукты деградации.

Как следует из данных представленных в табл. 1, только высокие концентрации тиаминa, в 22 раз превышающие концентрацию тирозина, вызывают снижение выхода 3-нитротирозина примерно на 50 %. Следовательно, константа скорости реакции взаимодействия пероксинитрита с тирозином примерно в 22 раза выше, чем кажущаяся константа скорости взаимодействия пероксинитрита с тиамином.

В то же время, константа скорости взаимодействия пероксинитрита с тioxромом почти на порядок (в 7 раз) превышает значение константы скорости взаимодействия пероксинитрита с тирозином. Поэтому даже низкие концентрации тioxрома оказывают защитный эффект и снижают выход 3-нитротирозина при взаимодействии пероксинитрита с тирозином

Таблица 1.

Ингибирование образования 3-нитротирозина в присутствии тиаминa и возрастание выхода оксидигидротиохрома при увеличении концентрации тиаминa в растворе. Концентрация тирозина -  $2,43 \cdot 10^{-4}$  М, концентрация пероксинитрита -  $2 \cdot 10^{-4}$  М

Состав раствора	Концентрация тиаминa (Т), или тиохрома (Тх), мкМ	Концентрация 3-нитротирозина, мкМ	Концентрация оксидигидротиохрома, мкМ
D-тип + OONO	-	19,3	-
D-тип + Т + OONO	97,5	19,0	0,125
D-тип + Т + OONO	975,6	17,0	1,12
D-тип + Т + OONO	2439	16,3	2,17
D-тип + Т + OONO	4878	11,8	3,19
D-тип + Тх + OONO	49,3	14,8	17,0
D-тип + Тх + OONO	97,0	10,1	35,0

В присутствии тиаминa и особенно тиохрома и оксидигидротиохрома модификация тирозинильных остатков в сывороточном альбумине человека и цитохроме с уменьшалась. Как известно, пероксинитрит эффективно модифицирует 411-й и 138 тирозинильные остатки альбумина [6]. Тиохром, оксидигидротиохром, тиамин также оказывали защитный эффект на цитохром с, снижали степень его инактивации пероксинитритом. Полученные результаты свидетельствуют, что тиохром, является более эффективным скэвенджером нитрозильных радикалов (более чем на 2 порядка) нежели сам тиамин. Мы предполагаем, что изучение антиоксидантных свойств и путей окислительных превращений гидрофобных метаболитов тиаминa имеет как фундаментальный интерес, так и прикладную значимость для разработки эффективных лекарств-антиоксидантов нового поколения.

#### Литература

1. Ischiropoulos H. (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* 305, p. 776-783.
2. Schopfer F.J., Baker P.R. e.a. (2003) *Trends Biochem Sci.* Vol. 28, p. 646-654.
3. Gryglewski R.J., Swies J., e.a. (2003) *Thromb Res.*, vol. 110, p. 323-329.
4. Stepuro I.I. *PLEFA*, 2005, vol. 72, p. 115-127.
5. Uppu R.M., Pryor W.A. // *Methods Enzymol.*-1996.-Vol. 269.-P. 322-329.
6. Jiao K., Mandapati S., e.a. *Anal Biochem.* 2001, vol. 293, p. 43-52.